

UNTERSUCHUNGEN ZUR CHOLESTERINKRISTALLBILDUNG
IN DER MENSCHLICHEN GALLE:
DER EINFLUSS VON PH-WERT UND PROTEINKONZENTRATION

Wolfgang Jakob

Aus der II. Medizinischen Klinik Großhadern der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. G. Paumgartner

UNTERSUCHUNGEN ZUR CHOLESTERINKRISTALLBILDUNG

IN DER MENSCHLICHEN GALLE:

DER EINFLUSS VON PH-WERT UND PROTEINKONZENTRATION

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wolfgang Jakob

aus

München

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. D. Jüngst

Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. Paumgartner

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.1986

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	1
3. Problemstellung	15
4. Material und Methoden	16
5. Ergebnisse	29
6. Diskussion	50
7. Zusammenfassung	69
8. Literaturübersicht	70



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1. Einleitung

Die Cholelithiasis stellt eines der wesentlichen Krankheitsbilder in der Gastroenterologie dar. Auf Grund der hohen Incidenz (44) wurden bereits im letzten Jahrhundert Überlegungen zur Pathogenese angestellt. Naunyn sprach bereits 1892 von einer Abschlüpfung von Zellmaterial von der Gallenblasenwand, das dann sekundär in einer "cholesterinization" (zitiert nach 24) von Cholesterin angefüllt wird. In der selben Zeit wurde über ein bei Entzündungsprozessen in der Gallenblasenwand sezerniertes pathologisches Protein, das die Cholesterinsteinbildung auslöst, spekuliert. Weitere Versuche zur Klärung der Ursache der Cholelithiasis entwickelten sich aus biochemischen und lipidphysiologischen Überlegungen.

2. Literaturübersicht

Zunächst wurde im Jahre 1960 die Lipidzusammensetzung von menschlicher Lebergalle durch Chromatographie auf kieselgelimprägniertem Papier untersucht. Als Hauptbestandteile fanden sich Lecithin, Lysolecithin und ein als "Cephalin" beschriebenes Phospholipid. Das molare Verhältnis wurde zu 0,52 bestimmt. Als weitere Lipidkomponenten wurden Cholesterinester und Triglyceride beschrieben (36).

Davon ausgehende vergleichende Untersuchungen an Blasengallen verschiedener Spezies durch Kieselgel-

säulenchromatographie erlaubten die Identifizierung folgender Lipide: Cholesterinester, freies Cholesterin, Triglyceride, Diglyceride, Freie Fettsäuren und Phospholipide. Zwischen menschlicher Blasengalle von Steinträgern und Gesunden fand sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Lipidzusammensetzung (32).

Die Entwicklung der Röntgenstrukturanalyse ermöglichte nun die Untersuchung der physikochemischen Vorgänge bei der Lösungsvermittlung des apolaren Cholesterins im wässrigen Milieu der Galle. Für diese Untersuchungen wurden Modellsysteme, d.h. durch Kopräzipitation von hochgereinigten Lipidbestandteilen hergestellte in-vitro-Systeme, verwendet.

Im Rahmen dieser Versuche wurde der Begriff der "gemischten Micelle", eines ca. 70 Angström messenden Systems aus den amphiphilen Molekülen Gallensäure und Phospholipid und dem apolaren Cholesterin, geprägt. Die Löslichkeit des Cholesterins ist nur bis zu einem bestimmten molaren Verhältnis von Cholesterin zu den Detergentien möglich; diese Konzentration wird als "kritische micelläre Konzentration" bezeichnet (40). Die so gewonnenen Erkenntnisse konnten nun auf die Untersuchung der Cholelithiasis angewandt werden. Der Vergleich der Gallenflüssigkeit bei Steinträgern und Gesunden zeigte Unterschiede im Sättigungsgrad des Cholesterins. Die drei wesentlichen Komponenten der

Galle, Gallensäuren, Phospholipide und Cholesterin wurden quantitativ bestimmt und Modellgallen mit den gleichen Konzentrationsverhältnissen hergestellt. Dabei zeigte sich, daß bei den in Steingallen gefundenen Konzentrationsverhältnissen das Cholesterin nicht mehr in Lösung gehalten werden konnte. Die Konzentrationen wurde als Punkt in ein gleichseitiges Dreieck eingetragen, dessen Seiten die drei oben genannten Komponenten repräsentierten. In diesem erschienen die Punkte der Steingallen oberhalb, die der Normalgallen unterhalb einer Linie, die der "kritischen micellären Konzentration" entspricht.

Die Löslichkeit des Cholesterins im Modellsystem zeigte eine deutliche pH-Abhängigkeit, da die Detergenswirkung der Gallensäuren durch Dissoziation im Alkalischen zunimmt (1).

In einer umfangreichen Arbeit an Modellsystemen wurden Unterschiede in der Wirksamkeit verschiedener Gallensäuren und die Bedeutung des Lecithins für die Lösung von Cholesterin aufgezeigt. Dabei zeigte sich, daß die Lösungsfähigkeit von der Art der Gallensäure abhängt. Die Unterschiede verwischten mit zunehmender Lecithinkonzentration in der untersuchten Lösung. Unterschiedliche Fettsäuremuster des verwendeten Lecithins beeinflussten die Löslichkeit jedoch nicht (17).

Durch Berechnung der Cholesterinlöslichkeit in Ab-

hängigkeit vom Gallensäure/Phospholipidverhältnis in einem solchen Modellsystem wurden die Verhältnisse in Zahlen ausgedrückt. Die Abhängigkeit konnte mit einem Polynom II.Ordnung beschrieben werden, übersättigte Lösungen bzw. Galleproben enthielten mehr Cholesterin als maximal löslich ist. Der Quotient von tatsächlicher Cholesterinkonzentration und maximal löslicher ergibt als Cholesterinsättigungsindex (CSI) einen mathematischen Ausdruck der Löslichkeitsverhältnisse. In untersättigten Proben ist diese Größe kleiner, in übersättigten größer 100% (43).

Eine weitere, wesentlich aufwendigere Studie dieser Art zeigte die Beeinflussung der Cholesterinlöslichkeit durch Ionenstärke, Gesamtlipidkonzentration und Temperatur. Lag eine hohe Gesamtlipidkonzentration vor, so war relativ zum Gallensäure/Phospholipidquotienten der Probe mehr Cholesterin löslich als bei niedriger.

Diese Abhängigkeit wurde bei gegebener Temperatur (37 °C) und Ionenstärke (0,15 mM NaCl) durch ein Polynom V.Ordnung, dessen Koeffizienten von der Gesamtlipidkonzentration abhängen, beschrieben. Dieser "korrigierte CSI" kam den natürlichen Verhältnissen recht nahe; beim Vergleich mit menschlichen Gallen fand sich eine enge Korrelation von Übersättigung mit dem Auftreten von Cholesterinkristallen (6).

Die Anwendung dieser Erkenntnisse auf natürliche Systeme brachte jedoch mehr und mehr Widersprüche zu Tage.

Durch Beobachtung des Verhaltens von Impfkristallen in über- bzw. untersättigten Blasengallen konnte festgestellt werden, daß die Grenze für die Auflösung bzw. das Wachsen der Cholesterinkristalle nicht - wie erwartet - bei einem CSI von 100% lag, sondern bei 76%. Das Wachstum der Impfkristalle war allein vom CSI abhängig, nicht jedoch ihr Auftreten in der nativen Blasengalle; dort wurden sie nur bei Steinträgern gefunden (51).

Holzbach konnte in einer weiteren Studie durch den Vergleich von 33 normalen menschlichen Blasengallen mit 35 pathologischen zeigen, daß die Übersättigung auch bei Gesunden vorkommt. Die Sättigungsgrenze mußte deutlich niedriger angesetzt werden, als bis dahin vermutet wurde. Da die Übersättigung allein kein hinreichendes Kriterium für die Entstehung von Cholesterinsteinen zu sein schien, wurden andere, bis dahin noch unbekannte Faktoren postuliert, die die Kristallbildung in übersättigten Lösungen auslösen bzw. verhindern (19).

Bei der Untersuchung von 100 operativ gewonnenen Blasengallen es sich 22 mal um Pigmentsteine und 67 mal um Cholesterinsteine. Zwar war die Galle der Cholesterinsteinträger im Durchschnitt stärker gesättigt als die

der Pigmentsteinträger; im Einzelfall konnte die Zugehörigkeit zu einer der Gruppen nicht aus der Gallenanalyse geschlossen werden (46).

Eine Arbeit, die über einen Monat je acht Duodenalproben unter standardisierten Ernährungsbedingungen, d.h. 12 Stunden nach einer Testmahlzeit, von fünf Männern und 10 Frauen untersuchte, zeigte große intraindividuelle Schwankungen des CSI. Eine Synchronisierung des CSI mit dem Menstruationszyklus der Frauen war nicht feststellbar. Diese Arbeit zeigte, daß eine einmalige Bestimmung des CSI noch keine verwertbare Aussage über die Verhältnisse in der Galle eines Patienten möglich macht (50).

Der Vergleich der Gallensäurekinetik von je sieben Steinträgern und Normalpersonen erbrachte keine signifikanten Unterschiede. In beiden Gruppen war die Duodenalgalle bei niedrigem Gallefluß übersättigt und bei hohem Fluß untersättigt. Daraus schlossen die Autoren auf eine extrahepatische, nicht durch die Zusammensetzung der Galle bedingte Ursache der Cholelithiasis (33).

Da all diese Untersuchungen darauf hinwiesen, daß die Kenntnis der Lipidzusammensetzung allein nicht ausreicht, die Verhältnisse in natürlicher Galle genau genug zu beschreiben, wurden verstärkt klinisch orien-

tierte Untersuchungen an Gallen von Cholelithiasispatienten durchgeführt.

So fand sich bei einer Untersuchung an 20 Cholecystektomiepatienten eine steigende Zahl von Cholesterinkristallen in der Blasengalle bei zunehmender Anzahl der Steine. In der nach Cholecystektomie durch T-Drain abgeleiteten Lebergalle wurden nie Kristalle gefunden. Es wurde daher angenommen, daß Kristalle nur in der Gallenblase entstehen; sie stellen offenbar eine Vorstufe der Cholesteringallensteine dar (47).

Eine klinische Untersuchung von 54 Duodenalgallen und 17 Blasengallen auf Cholesterinkristalle ergab Folgendes: Bei fünf von acht Fällen asymptomatischer Steine konnten im Duodenalsekret durchschnittlich 169 Kristalle pro μ l nachgewiesen werden. Der CSI lag bei 162%. Die drei kristallfreien Gallen stammten von Patienten mit - nach radiologischen Kriterien - Pigmentsteinen. Die verbleibenden Patienten zeigten keine Cholesterinkristalle; dabei war in 10 Fällen die Galle untersättigt, in 36 Fällen übersättigt. 23 Gallen befanden sich im Zustand der Metastabilität, keine davon entwickelte innerhalb von 48 Stunden Kristalle.

Die 17 Cholecystektomiefälle zeigten bei 11 Patienten sofort, bei drei nach 24 Stunden Kristalle; in all diesen Fällen handelte es sich um Cholesterinsteine.

Die drei kristallfreien Gallen stammten von Pigmentsteinträgern. Der Vergleich dieser Befunde mit den jeweiligen CSI-Werten ergab keinen eindeutigen Zusammenhang. Die Autoren vermuteten deshalb weitere, über die Lipidkomposition hinausgehende Einflüsse auf die Kristallentstehung, die möglicherweise auf Proteine zurückzuführen sind (38).

Die Untersuchung von 89 Blasengallen, wovon 23 Cholesterinsteine, 7 Pigmentsteine und 59 keinerlei Steine enthielten, erbrachten keinen signifikanten Unterschied im CSI. In beiden Gruppen lagen die durchschnittlichen CSI-Werte über 100%.

Daraus wurde der Schluß gezogen, daß nicht die Lipidkomposition, sondern das Vorhandensein oder Fehlen von Kristallen Steingallen von Normalgallen unterscheidet. Das Auftreten der Kristalle müßte also anders erklärt werden (37).

Ein gänzlich neuer Aspekt ergab sich durch die Untersuchung von 63 pathologischen und 57 normalen Blasengallen auf ihre Nukleationszeit. Frisch gewonnene Proben wurden durch Ultrazentrifugation von eventuell vorhandenen Cholesterinkristallen befreit, bei 37 °C inkubiert und täglich auf neu entstandene Cholesterinkristalle untersucht. Die Zeit vom Beginn der Inkubation bis zum erstmaligen Nachweis der Kristalle wurde als Nukleationszeit bezeichnet.

Während die Steingallen durchschnittlich nach 2,9 Tagen die ersten Kristalle zeigten, lag die durchschnittliche Nukleationszeit der Kontrollen bei 15 Tagen. Bei normalen Gallen korrelierte die Nukleationszeit eng mit dem CSI ($r = -0,84$); bei den pathologischen Gallen war keine Korrelation feststellbar (18).

Der Zusatz von nur 10 Volumen% einer steinhaltigen Blasengalle zu den isotropen Schichten einer ultrazentrifugierten hepatischen Kontrollgalle verkürzte deren Nukleationszeit auf den Wert der Steingalle. Daraus wurde auf einen potenten nukleierenden Faktor in der Steingalle geschlossen (4).

Diese Beobachtungen ließen den Einfluß nichtlipidartiger Substanzen auf die Nukleation des Cholesterins und damit auf die Steinbildung wahrscheinlich werden. Deshalb wurden native Gallen auf potentiell nukleationsfördernde oder hemmende Faktoren untersucht.

Durch Verfütterung einer cholesterinreichen, lithogenen Diät an 43 Hunde wurde der Einfluß von erhöhter Mucusekretion auf die Steinbildung untersucht. Eine erhöhte Cholesterinsekretion führte zu verstärkter Mucussekretion in der Gallenblasenwand, meßbar durch die Inkorporation von ³H-Glucosamin in der Gewebekultur. Dabei ergab sich Folgendes: Nach fünf Tagen wurde eine maximale Verstärkung der Glycoproteinsekretion, nach Ab-

setzen der Diät ein Rückgang auf den Ausgangswert beobachtet.

Mucus aus menschlichen Gallenblasen führte zu Nukleation von Cholesterinkristallen aus der übersättigten Lebergalle der Versuchstiere (25).

Die Untersuchung von je neun Blasen und Lebergallen von Steinträgern und Kontrollpersonen erbrachte eine schnellere Nukleation der Blasengalle gegenüber der Lebergalle, obwohl letztere im Durchschnitt stärker gesättigt war. Hohe Mucopolysaccharidkonzentrationen in der Lebergalle gingen mit verlangsamter Nukleation in der Blasengalle des jeweiligen Patienten einher (14).

Der Vergleich eines Modellsystems mit der durch Zusetzen von gereinigten Lipiden auf gleiche Konzentrationsverhältnisse angereicherten Normalgalle, beide mit einem CSI von 115%, zeigte bei letzterer eine deutlich verlängerte Nukleationszeit. Durch Zugabe einer delipidisierten Proteinfraktion aus einer Normalgalle konnte die Nukleationszeit des Modellsystems verdreifacht werden. Daraus wurde auf eine erhebliche nukleationshemmende Wirkung der Gallenproteine geschlossen (21).

Auf der Suche nach weiteren Bestandteilen der Blasengalle wurden mit immunologischen Methoden sogenannte

"Immunoreaktivitäten" gefunden, die das Vorhandensein von Apolipoprotein A-I, A-II, C-II, C-III und B anzeigen. Dazu wurden vorher auf ihre Spezifität getestete Radioimmunoassays sowie Antiseren vom Kaninchen verwandt.

Die gefundenen Apoproteinmuster unterschieden sich von denen im Plasma, so daß eine Verunreinigung bei der Probengewinnung unwahrscheinlich erschien. Die Konzentrationen lagen zwischen 1,5% und 10% der Serumkonzentration. Die Perfusion isolierter Rattenlebern mit menschlichem HDL führte zur Ausscheidung von Apo-A-I und Apo-A-II über die Galle. Bei der Perfusion mit LDL konnte Apo-B nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Apoproteinmuster fielen keine Unterschiede zwischen Stein- und Normalgallen auf, bei letzteren war die Gesamtproteinkonzentration jedoch höher (39).

In einer weiteren Studie wurde die Galle auf freie Fettsäuren untersucht, die dünnschichtchromatographisch von anderen Lipiden getrennt wurden. Durch die High Performance Liquid Chromatography wurden sie nach Kettenlänge und Doppelbindungen aufgetrennt. Bei Gesunden fanden sich insgesamt weniger freie Fettsäuren als in Steingallen, was auf Phospholipaseaktivität in der Gallenblasenwand zurückgeführt wurde. Erhöhte Spiegel an freien Fettsäuren beeinträchtigten die Löslichkeit von Cholesterin (29).

Alle diese klinischen Beobachtungen machten eine neue theoretische Basis hinsichtlich des Lipidtransports in der Galle notwendig. Neuere physikalische Methoden erlaubten nun eine genauere Definition dieser Transportsysteme.

Die Anwendung des Quasi-elastischen Lichtstreuungsverfahrens auf menschliche Lebergalle brachte Lipidpartikel mit einer durchschnittlichen Größe von 680 Angström zum Vorschein. Da gemischte Micellen im Durchschnitt um Faktor 10 kleiner sind, mußte es sich um eine andere Form von Partikeln handeln, die als "Vesikel" bezeichnet wurden. Diese blieben nach Abdialysieren der Gallensäuren erhalten (41).

Durch Trennung biliärer Proteine von den Lipiden konnte gezeigt werden, daß spezifische Galleproteine für die Länge der Nukleationszeit ausschlaggebend sind. Deproteinisierte Nativgallen zeigten verkürzte, mit biliären Proteinen versetzte Modellsysteme verlängerte Nukleationszeiten. Die Anwendung proteolytischer Enzyme auf die Galle verkürzte die Nukleationszeit, die Zugabe von Albumin zu deproteinisierten Nativgallen und zu Modellsystemen zeigte keine Wirkung (20). Durch Zugabe von gereinigtem Mucin aus menschlicher Gallenblasenwand zu einem Modellsystem wurde dessen Nukleation beschleunigt. Nach fünf und zehn Tagen Beobachtung war die Zahl der entstandenen Cholesterinkristalle pro Volumenein-

heit signifikant höher als im unbeeinflussten Kontrollsystem. Mucin aus Steingallenblasen förderte die Nukleation signifikant stärker als gleiche Mengen aus Normalgallen. Somit konnte ein nukleationsfördernder Faktor im Mucin, speziell bei Steingallen postuliert werden (26).

Durch Gelchromatographie und anschließende Untersuchung mit quasi-elastischer Lichtstreuung konnten Sömjen und Gilat, die bereits oben erwähnt sind (41), zeigen, daß das Cholesterin in der Galle sowohl vesikulär, in Partikeln mit ca. 800 Angström Durchmesser, wie micellär, in Partikel mit ca. 70 Angström Durchmesser, gelöst ist. Mit steigender Gallensäurekonzentration in der Elutionslösung nimmt die vesikuläre Form ab und die micelläre zu (41).

3. Problemstellung

Das Auftreten von Cholesterinmonohydratkristallen gilt als Voraussetzung für die Entstehung von Gallensteinen (37,38,47). Die Bestimmung der wesentlichen Lipidbestandteile der Galle, Gallensäuren, Phospholipide und Cholesterin haben nicht ausgereicht, die Nukleation von Cholesterin vorherzusagen (18,19,51).

Deshalb wurde nach anderen Faktoren gesucht, die die Cholesterinnukleation beeinflussen könnten. Im Einzelnen wurden neben den oben genannten Größen der Gehalt an Triglyceriden, Freien Fettsäuren und Proteinen sowie der pH-Wert bestimmt (8,32).

Ferner wurden an einem weiteren, kleineren Kollektiv das Proteinmuster elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei konnte geklärt werden, in wie weit die genannten Parameter mit dem Auftreten bzw. Fehlen von Cholesterinkristallen vergesellschaftet sind.

4. Material und Methoden

4.1. Patienten

Bei 57 Cholecystektomien in der Chirurgischen Klinik des Klinikums Großhadern wurden die Gallenproben intraoperativ gewonnen. Es handelte sich um 41 Frauen und 16 Männer mit einem Durchschnittsalter von 52 Jahren (21 - 81 Jahre).

In 39 Fällen lag eine nur durch Sonographie bestätigte Cholelithiasis vor, 7 Fälle wiesen Steine im Cholecystogramm auf. Weitere zwei Patienten wurden wegen kombinierter Cholecystcholangelithiasis operiert. In fünf Fällen handelte es sich um sonographisch nachgewiesene Steine bei negativem Cholecystogramm. Dreimal fanden sich die Steine bereits in der Abdomenübersichtsaufnahme, einmal bei der ERCP.

4.2. Probengewinnung

Während der Operation wurde die Galle durch Punktion in eine sterile Spritze gefüllt und unter Temperaturkonstanz der pH-Messung zugeführt. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Spritze keine Luftblasen enthielt. Gleichzeitig wurde eine Kultur angelegt; zweimal wurden dabei Bakterien (*Pseudomonas* bzw. *E.coli*) gefunden, was zum Ausschluß dieser Proben aus der Studie führte. Ferner wurden vier sogenannte weiße Gallen bei Cysticusverschluß beobachtet, die keine Gallensäuren enthielten. Diese wurden ebenfalls nicht in die Studie aufgenommen.

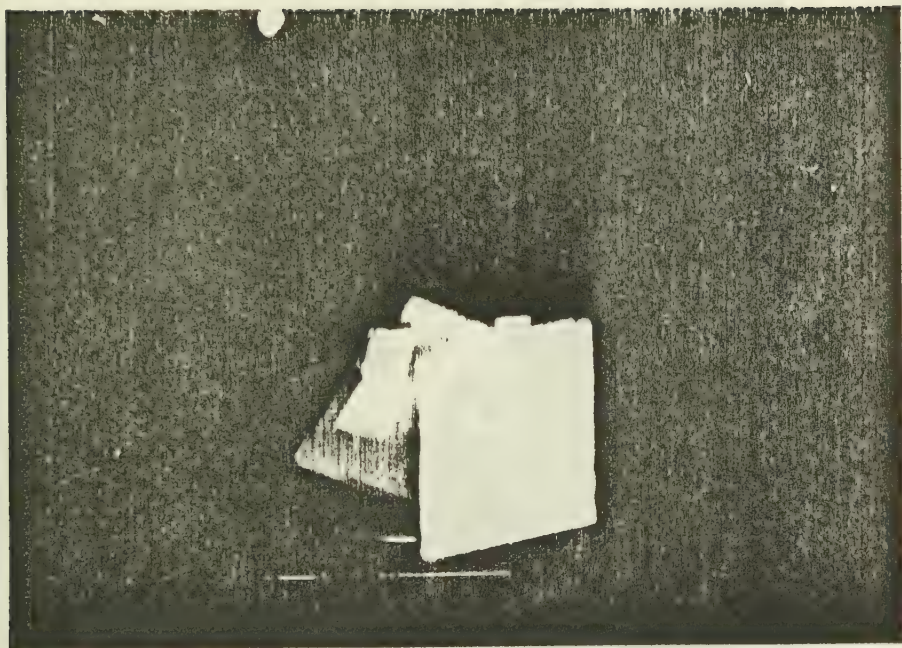
Somit verblieben 51 Proben, 38 von Frauen und 13 von Männern mit einem Alter von 27 bis 81 Jahren, im Durchschnitt 52 Jahre.

Nach Kristallanalyse und pH-Messung wurden die Proben bei ^o-40 C fraktioniert tiefgefroren.

4.3. Mikroskopische Kristallanalyse

Die in den Spritzen befindliche Galle wurde durch Kippen gemischt und ein Tropfen auf einen gewärmten Objektträger gegeben. Die Proben wurden mit einem Zeiss Phasenkontrastmikroskop mit Zeiss Neofluar PH 2 16x-Objektiv untersucht. Von den Kristallen wurden photographische Aufnahmen auf Kodak Ektachrome und Ilford Pan F Film gefertigt. Die ersten 10 Proben wurden zum Vergleich im Anschluß noch mit einem Zeiss Polarisationsmikroskop mit 10x Objektiv untersucht.

Abbildung 1



Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme eines
Cholesterinmonohydratkristalls

Bei dieser Methode erschienen die Kristalle als
doppelbrechende Strukturen. In dieser Technik wurden
ebenfalls Aufnahmen auf dem gleichen Filmmaterial
angefertigt.

Abbildung 2



Polarisationsoptische Aufnahme von Cholesterinkristallen

4.4. pH-Messungen

Zur pH-Messung wurde ein Aliquot der Gallenprobe aus der Spritze in ein Probenröhrchen gefüllt. Dieses Umfüllen wurde unter Stickstoffabschluß durchgeführt, um atmosphärische Einflüsse weitgehend auszuschalten und CO_2 -Verluste gering zu halten. Daraufhin wurde der pH-Wert mit einem elektronischen pH-Meter mit Glaselektrode bestimmt. Das pH-Meter wurde an zwei Pufferlösungen (pH 4,00 und pH 10,00)

geeicht.

Um eine Vorstellung von den Veränderungen des pH-Wertes in der Galle nach Probengewinnung zu erhalten, wurden zehn Proben bei 37 °C unter Luftabschluß inkubiert und nach 30, 60, 120 und 240 min der pH-Wert wie oben beschrieben gemessen.

4.5. Gallensäurebestimmung

Zur Gallensäurebestimmung wurden 20 µl Probe mit 200 µl Methanol bei -18 °C über Nacht extrahiert, nach 2 min Zentrifugation 20 µl des Überstandes in 1 ml einer 1M Glycinpufferlösung (pH 9,4) mittels 3α-Hydroxysteroiddehydrogenase und 0,1 ml 5,4 mM NAD-Lösung oxydiert. Die Extinktionszunahme des reduzierten NADH wurde bei 340 nm an einem Beckmann - Spektralphotometer gemessen. Nach Abzug der Leerwerte für NAD-, Enzym- und Pufferlösung und des Probenleerwertes wurde die Gallensäurekonzentration durch Vergleich mit einer Standardreihe (10 µg, 20 µg und 40 µg Cholsäure) berechnet (35).

4.6. Phospholipidbestimmungen

Phospholipide in der Galle wurden colorimetrisch und enzymatisch bestimmt.

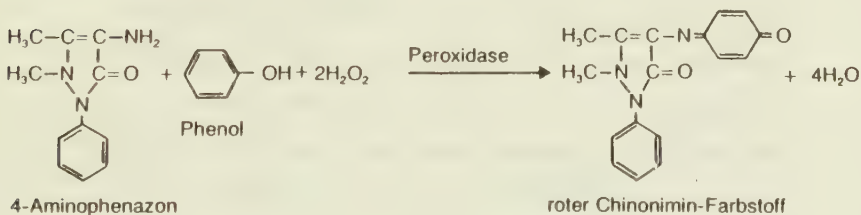
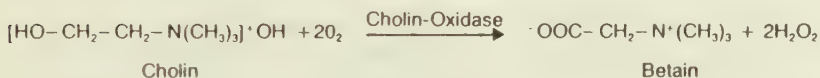
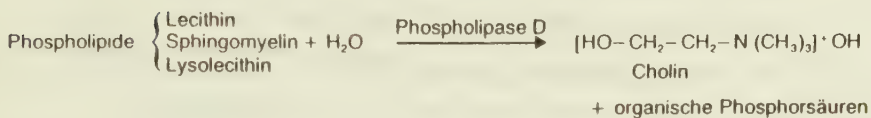
Zur colorimetrischen Bestimmung wurden 0,5 ml Galle mit 4 ml eines Gemischs aus Chloroform und Methanol (1:1 v/v) versetzt, nach 10 min kräftig geschüttelt, dann weitere 4ml Chloroform und 1 ml destilliertes

Wasser zugegeben, diese Mischung mehrfach gekippt und nach dem Absetzen der Chloroformschicht zentrifugiert. Daraufhin wurden 2ml der Chloroformphase entnommen, das Lösungsmittel im N_2 -Strom entfernt und 2 ml 10 n H_2SO_4 sowie einige Tropfen 30% H_2O_2 zugegeben. Bei 150 C im Wärmeschrank wurde über 4,5 Stunden der Phosphatrest vom Lipidmolekül abgespalten. Dieser Phosphatrest bildet mit Ammoniumheptamolybdat unter Katalyse von Aminohydroxynaphthaleinsulfonsäure durch Reduktion mit Natriumdisulfit einen blauen Farbkomplex. Dessen Extinktion wurde bei 830 nm an einem Beckmann Spektralphotometer gemessen. Die Berechnung erfolgte unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren anhand einer Standardreihe mit 10, 25, 50, 75 und 100 nmol PO_4 -Einsatz (11).

Zur enzymatischen Bestimmung wurde die Probe mit der 10-fachen Menge destillierten Wassers verdünnt und in den Kit der Firma Wako Chemicals, Osaka, Japan eingesetzt. Dabei wird das Lecithin, das 98% der Phospholipide in der Galle ausmacht (23), durch Phospholipase gespalten. Dabei entsteht Phosphatidsäure und Cholin. Das Cholin wird durch Cholin oxydase oxydiert; dabei entsteht in stöchiometrischem Verhältnis H_2O_2 , das mit Phenol und 4-Aminophenazon das rote 4-(p-Benzochinon)-moniminophenazon bildet. Dessen Extinktion wurde bei 546 nm am Hg-Photometer gemessen (45). Die Berechnung erfolgte durch Vergleich mit einem im

Kit enthaltenen Cholinstandard. Diese Methode wurde 1981 für die Galle beschrieben (16).

Abbildung 3



Reaktionsabläufe bei der enzymatischen Phospholipidbestimmung

Um einen Vergleich zwischen beiden Methoden zu erhalten, wurden die Phospholipidkonzentrationen von 13 Galleproben mit beiden Methoden bestimmt.

4.7. Quantitative Cholesterinbestimmung

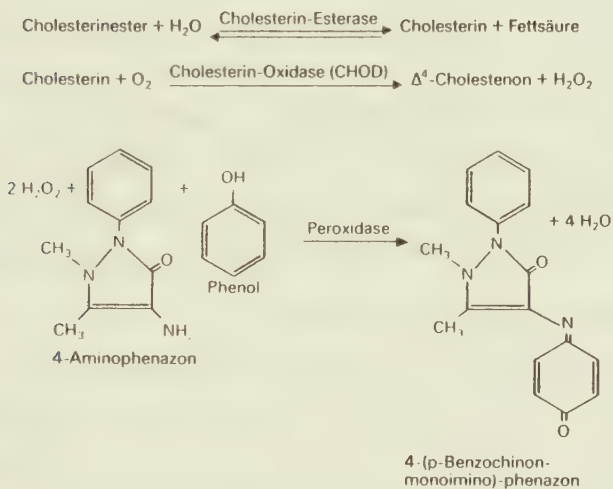
Zur quantitativen Cholesterinbestimmung besteht ebenfalls eine enzymatische und eine colorimetrische Methode.

Für die colorimetrische wie für die enzymatische mußte das Cholesterin durch Extraktion aus der Galle isoliert werden. Dazu wurde 1 ml Galle mit 5ml Petrolbenzin (Merck Darmstadt) ausgeschüttelt. 4 ml der Petrolbenzinphase wurden entnommen und das Lösungsmittel unter N_2 abgedampft.

Für die colorimetrische Bestimmung wurde die getrocknete Probe mit einem Farbreagenz, das 7 mmol/l Essigsäure und 6,5 mmol/l Essigsäureanhydrid enthielt, versetzt. Nach 5 min Inkubation bei 25 °C im Wasserbad wurde das Reaktionsgemisch mit konzentrierter Schwefelsäure unterschichtet und nach Kühlung und Vermischung erneut 10 min bei 25 °C inkubiert. Der entstehende Farbkomplex wurde bei 578 nm am Hg-Photometer gemessen. Für die enzymatische Cholesterinoxidase - Peroxydasemethode, die in Form eines Kit von Boehringer Mannheim erworben wurde, wurde die getrocknete Probe mit 2,5 ml Reaktionsgemisch versetzt. Bei der Inkubation werden eventuell vorhandene Cholesterinester verseift, das Cholesterin mit Luftsauerstoff zu Cholestenon oxydiert. Das entstehende H_2O_2 oxydiert durch Peroxydase in stöchiometrischem Verhältnis 4-Aminophenazon und Phenol zu rotem 4-(p-Benzochinon)-moniminophenazon, dessen Menge bei 546 nm

am Hg-Photometer gemessen wurde.

Abbildung 4



Reaktionsabläufe bei der enzymatischen

Cholesterinbestimmung

Enzymatische wie colorimetrische Cholesterinbestimmung

wurden durch Preciset^R von Boehringer Mannheim geeicht.

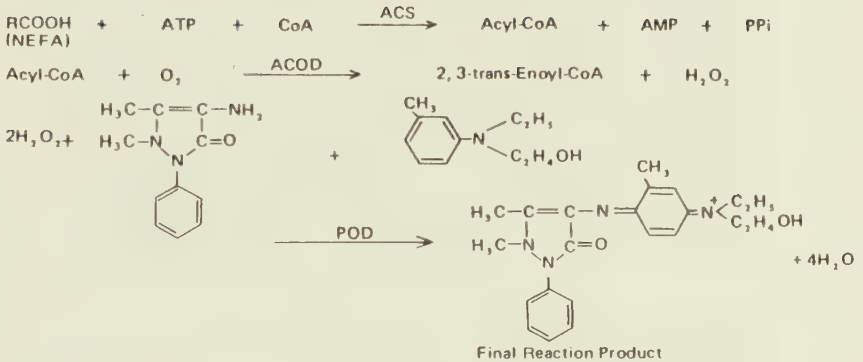
4.8. Bestimmung der Triglyceride

Die Triglyceridbestimmung wurde mit dem UV-Test der Firma Boehringer Mannheim durchgeführt. Dabei wird das Triglyceridmolekül in äthanolischer KOH gespalten, die Fettsäuren werden mit MgSO_4 gefällt und abzentrifugiert, das im Überstand befindliche Glycerin mit Glycerokinase phosphoryliert. Das benötigte ATP wird aus der Reaktion von Phosphoenolpyruvat und ADP zu Pyruvat und ATP gewonnen. In der eigentlichen Meßreaktion wird Pyruvat von NADH zu Lactat reduziert. Die Extinktionsabnahme bei 366 nm am Hg-Photometer ist ein Maß für die ursprünglich eingesetzte Menge Triglycerid.

4.9. Bestimmung der Freien Fettsäuren

Zur Bestimmung der Freien Fettsäuren wurden 0,5 ml Galle mit Chloroform-Methanol extrahiert, wie oben für die Phospholipidbestimmung beschrieben. Die getrockneten Lipide wurden mit dem NEFA-Kit der Firma Wako Chemicals, Osaka, Japan versetzt. Das darin enthaltene Enzym Acyl-CoA-Synthetase bildet aus den Carbonsäuren und CoA Acyl-CoA-Moleküle. Die Acyl-CoA-Moleküle werden enzymatisch oxydiert. Das dabei frei werdende H_2O_2 oxydiert Aminophenazon zu einem roten Farbkomplex, dessen Extinktion bei 546 nm Hg gemessen wurde (34). Als Referenzgröße diente ein im Kit enthaltener 1 mM Ölsäurestandard; zu jeder Probe wurde ein Probenleerwert ermittelt.

Abbildung 5



Reaktionsabläufe bei der enzymatischen Bestimmung von
Freien Fettsäuren

4.10. Proteinbestimmung nach Lowry

Zur quantitativen Proteinbestimmung nach Lowry wurden 50 µl der Blasengalle mit 1 ml 10%-iger Trichloressigsäure vermischt und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Das so gefällte Eiweiß wurde abzentrifugiert, das gefällte Protein mit 1 ml Methanol vermischt und zur Extraktion eventuell störender Gallensalze erneut bei -18 °C über Nacht inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Metha-

nol entfernt und das gereinigte Protein im N₂-strom getrocknet. Das Protein wurde mit 500 μ l 1 n NaOH gelöst und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

Nach Inkubation wurde 1 ml einer aus 50 ml 2% Na₂CO₃ und je 1 ml 1% CuSO₄ und 1 ml KNa-Tartrat bestehenden Pufferlösung zugefügt, nach weiteren 10 min 100 ml Folin-Ciocalteu-Reagenz/H₂O im Verhältnis 1:1. Nach 30 min Inkubation bildet sich ein blauer Farbstoff, der bei 750 nm am Spektralphotometer gemessen wurde (27). Die Berechnung erfolgte durch Vergleich mit einer Rinderalbuminstandardreihe. Zur Qualitätskontrolle wurde ein Testserum (Precilip^R) mitgeführt.

4.11. SDS-Polyamidgelelektrophorese

Um einen Überblick über die in der Galle enthaltenen Proteine zu gewinnen, wurden 9 kristallhaltige und 6 kristallfreie Gallen, die nicht zum oben beschriebenen Kollektiv gehörten, mittels einer Amicon XM 300 - Membran konzentriert und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde mit einem Tris-HCl (37,5 mM, pH 8,8) - Puffer gemischt, der 2% SDS enthielt. Nach zweistündiger Inkubation bei 50 °C wurden die Proteine auf einer vertikalen Gelplatte mit 4 - 22,5% Acrylamidgehalt getrennt. Nach Fixation mit 20% (w/v) Trichlor-essigsäure wurden die Proteine mit Commassieblau G 250 gefärbt. Zur Identifizierung der Banden wurden 6 Referenzproteine unterschiedlichen Molekulargewichts mitgeführt (28,49).

4.12. Ermittlung des Cholesterinsättigungsindex (CSI)

Um den Proben einen Cholesterinsättigungsindex (CSI) zuordnen zu können, wurde die von Carey und Small (6) beschriebene Methode des "korrigierten CSI" in Abhängigkeit von der Gesamtlipidkonzentration in ein Rechnerprogramm umgesetzt. Auf einem Hewlett-Packard 41 C Rechner waren ca. 500 Einzelschritte erforderlich. Um die Richtigkeit der Programmierung zu überprüfen, wurden alle 76 in der Arbeit (6) angegebenen Beispiele nachgerechnet. Dabei ergaben sich Abweichungen von maximal 2%.

4.13. Statistik

Die Werte der Einzelbestimmungen wie des errechneten CSI wurden auf der Rechenanlage des Klinikums Großhadern mittels des Rangsummentests nach Wilcoxon, Mann und Whitney verglichen. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,01$ angenommen.

5. Ergebnisse

5.1. Patienten

Es wurden 57 Proben gewonnen, zwei erwiesen sich als bakteriell kontaminiert, vier waren durch Verschluss des Ductus cysticus zu sogenannten "weißen Gallen" (46) geworden, die keine Gallensäuren enthalten.

Somit verblieben 51 Proben, 38 von Frauen und 13 von Männern.

Das Durchschnittsalter war 52 Jahre bei einer Spannweite von 27 bis 82 Jahren.

5.2. Kristallanalyse

Mittels der phasenkontrastmikroskopischen und polarisationsmikroskopischen Methode konnten in 27 Galleproben Cholesterinmonohydratkristalle nachgewiesen werden.

In der Kristallgruppe war das Verhältnis Männer zu Frauen 4:23, in der kristallfreien Gruppe 9:15.

Das Alter der Kristallgruppe bewegte sich zwischen 27 und 82 Jahren, das der kristallfreien Gruppe zwischen 36 und 70 Jahren.

5.3. pH-Wert-Bestimmungen

In der Kristallgruppe ergaben sich Werte von 7,10 bis 8,70, Median 8,10. Die kristallfreien Gallen wiesen pH-Werte von 7,30 bis 8,60, Median 7,75 auf.

Dieser Unterschied war im Wilcoxon-Test signifikant bei $p < 0,01$.

Bei den Versuchen zur Änderung des pH über insgesamt

240 min wurde ein Abfallen des pH zwischen 0% und 5% beobachtet.

Abbildung 6



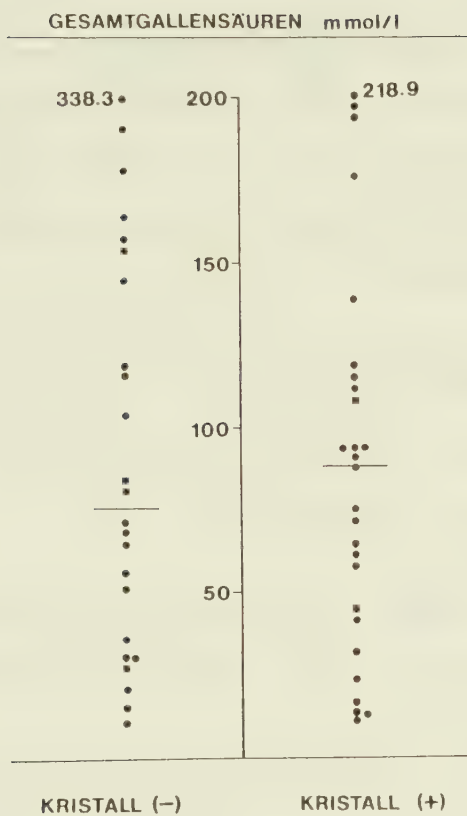
Graphische Darstellung der pH-Werte

5.4. Messung der Gesamtgallensäurekonzentration

Die Bestimmung der Gesamtgallensäurekonzentration ergab für die Kristallgruppe Werte zwischen 11,4 mmol/l und 218,9 mmol/l, Median 88,2 mmol/l. In der kristallfreien Gruppe ergaben sich Werte zwischen 11,2 mmol/l und 338,3 mmol/l, Median 75,1 mmol/l.

Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant.

Abbildung 7



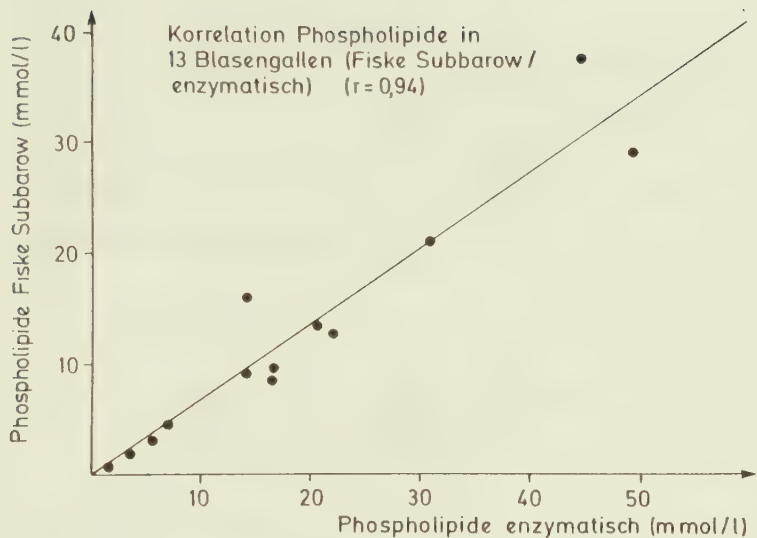
Graphische Darstellung der Gesamtgallensäure-
konzentration

5.5. Phospholipidbestimmungen

Zunächst wurden an 13 Galleproben Doppelbestimmungen sowohl mit der enzymatischen als auch mit der colorimetrischen Methode durchgeführt. Wie in Abbildung 8 ersichtlich, ergab sich eine gute Übereinstimmung mit beiden Methoden. Die Konzentrationswerte, die mit der colorimetrischen Methode ermittelt wurden, waren jedoch wegen der bei dieser Methode erforderlichen, offenbar mit Verlusten behafteten Lipidextraktion deutlich niedriger.

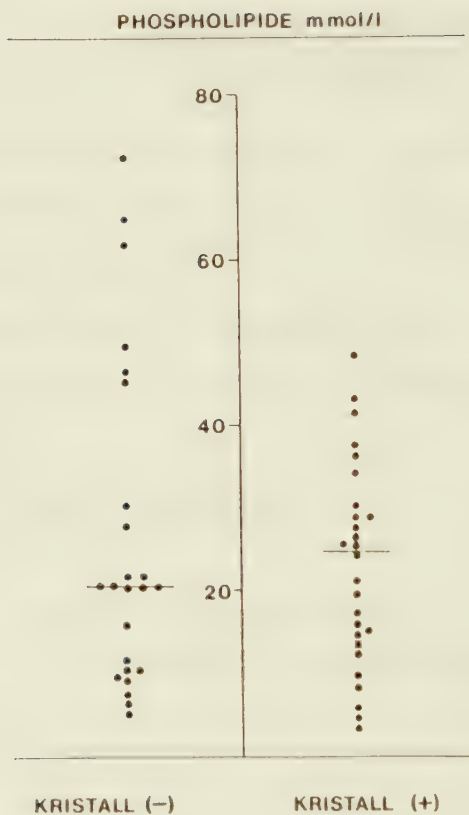
Aus diesem Grund - und wegen der einfacheren Durchführung - wurden die Phospholipide enzymatisch bestimmt.

Abbildung 8



Korrelation der enzymatische/colorimetrische
Phospholipidbestimmung in 13 Blasengallen

Abbildung 9



Graphische Darstellung der Phospholipidkonzentrationen

Die Phospholipidkonzentrationen der Kristallgruppe reichten von 3,8 mmol/l bis 48,3 mmol/l, Median 20.6 mol/l; die der kristallfreien Gallen von 5,4 mmol/l

bis 83,1 mmol/l, Median 20,6 mol/l.

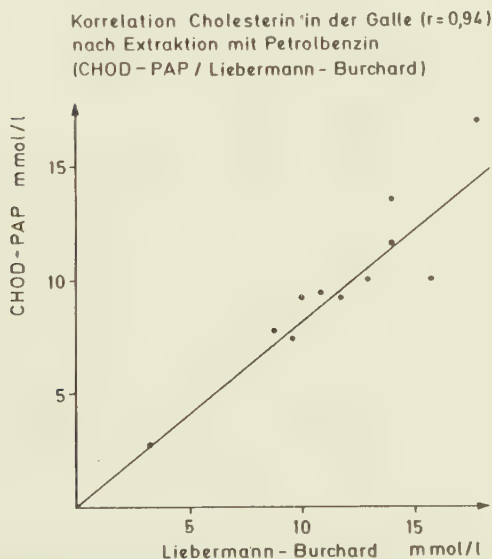
Dieser Unterschied war nicht signifikant.

5.6. Cholesterinbestimmungen

Wie oben beschrieben, gibt es auch für die Quantifizierung des Cholesterins eine enzymatische (CHOD - PAP) und eine colorimetrische Methode.

Beide Methoden wurden zum Vergleich an 11 Gallenproben parallel durchgeführt.

Abbildung 10

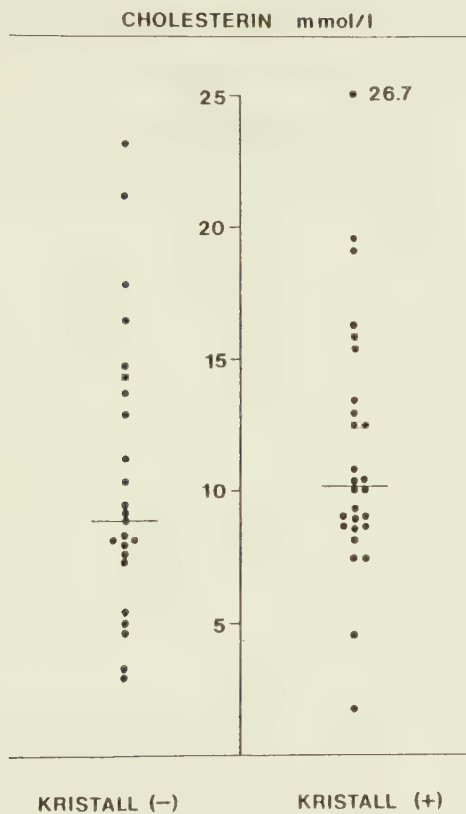


Korrelation der enzymatisch/colorimetrisch in der Galle bestimmten Cholesterinwerte ($n=11$)

Die beiden Methoden korrelierten eng, der Korrelationskoeffizient war $r=0,94$.

Da Vorversuche wiederholt Beeinflussungen der Enzyme durch Reste organischer Lösungsmittel gezeigt hatten und die colorimetrische Bestimmung eine bessere Extraktion erlaubte, wurde für die Cholesterinbestimmung die colorimetrische Methode gewählt.

Abbildung 11



Graphische Darstellung der Cholesterinkonzentrationen

Damit wurden in der Kristallgruppe Werte von 1,7 mmol/l bis 26,7 mmol/l gemessen, der Median lag bei 10,1 mmol/l.

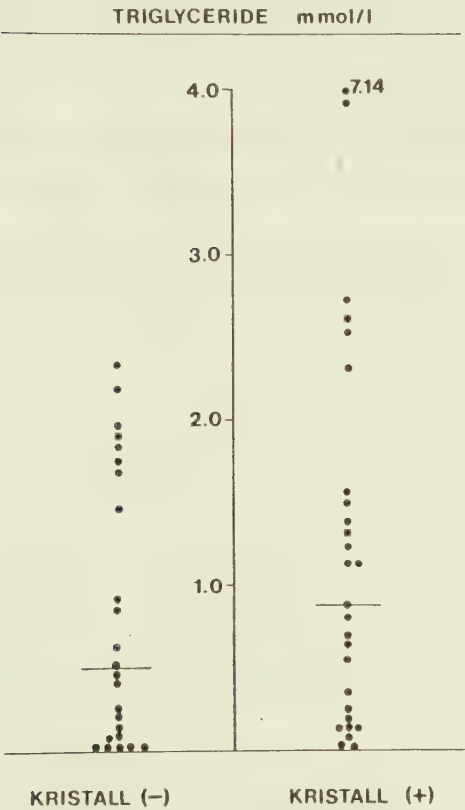
Die kristallfreien Gallen enthielten zwischen 2,8 mmol/l und 23,1 mmol/l, Median 8,9 mmol/l.

Im Durchschnitt war der Cholesteringehalt der kristallfreien Gallen zwar etwas niedriger, dieser Unterschied war statistisch jedoch nicht signifikant.

5.7. Quantitative Triglyceridbestimmung

Die Bestimmung der Triglyceridkonzentrationen ergab

Abbildung 12



Graphische Darstellung der Triglyceridkonzentrationen

für die Kristallgruppe Werte von 0.00 mmol/l bis 7,20 mmol/l; die kristallfreien Gallen enthielten 0.00 bis 2,4 mmol/l. Dieser Unterschied war nicht signifikant.

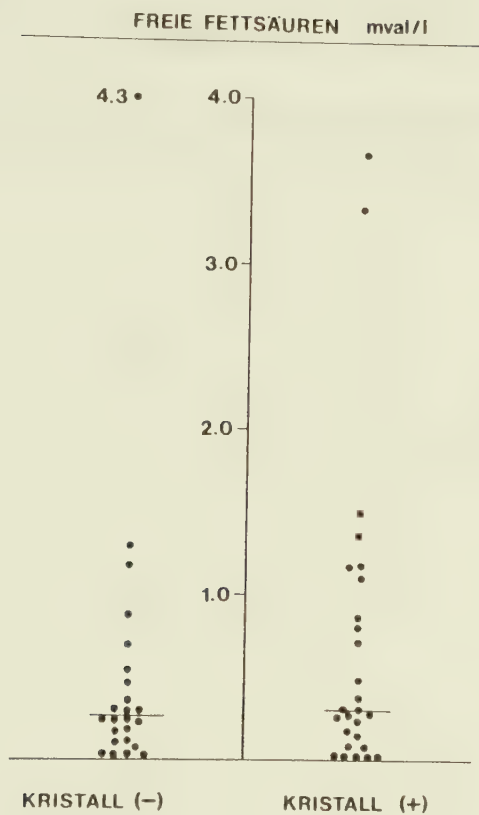
5.8. Quantifizierung der Freien Fettsäuren

Die quantitative Messung der freien Fettsäuren ergab in der Kristallgruppe Werte von 0.00 mmol/l bis 3,34 mmol/l, Median 0,25 mmol/l.

Die kristallfreien Gallen zeigten Konzentrationen zwischen 0.00 mmol/l und 4,26 mmol/l, Median 0,26 mmol/l.

Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant.

Abbildung 13



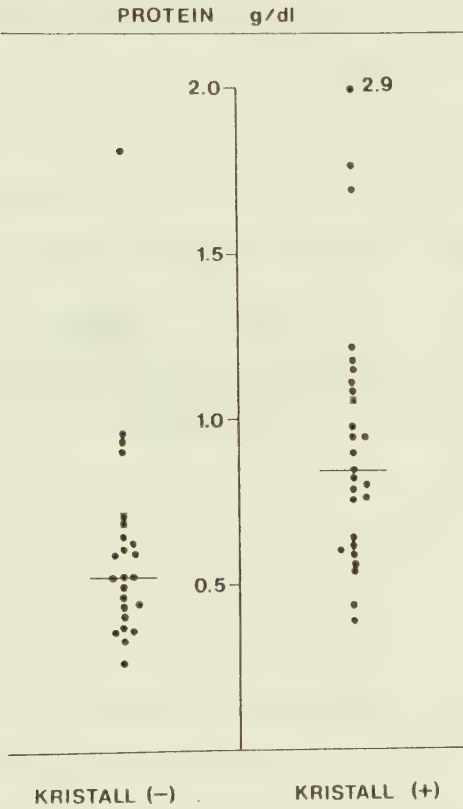
Konzentrationen der Freien Fettsäuren

5.9. Quantitative Gesamtproteinbestimmung

Die nach der modifizierten Lowry-Methode bestimmte Gesamtproteinkonzentration lag in der Kristallgruppe bei Werten zwischen 0,32 g/dl und 2,92 g/dl, Median 0,85 g/dl.

Die kristallfreien Gallen erbrachten Proteinkonzentrationswerte von 0,27 g/dl bis 1,81 g/dl, Median 0,52 g/dl.

Abbildung 14



Graphische Darstellung der Gesamtproteinkonzentration

Die Proteinkonzentration in der Kristallgruppe war statistisch signifikant höher ($p < 0.01$) als in der

kristallfreien Gruppe.

5.10. Ergebnisse der SDS-Polyamidgelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese der 9 kristallhaltigen und 6 kristallfreien Gallen zeigte 10 Banden von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 15 000 bis 75 000. Die Proteine waren von Probe zu Probe unterschiedlich stark vertreten. Zwei kräftige Banden mit einem Molekulargewicht von 27 000 und 32 000 waren in den meisten Proben vorhanden. Daneben fand sich häufig noch Albumin.

Systematische Unterschiede zwischen kristallhaltigen und kristallfreien Proben wurden nicht beobachtet.

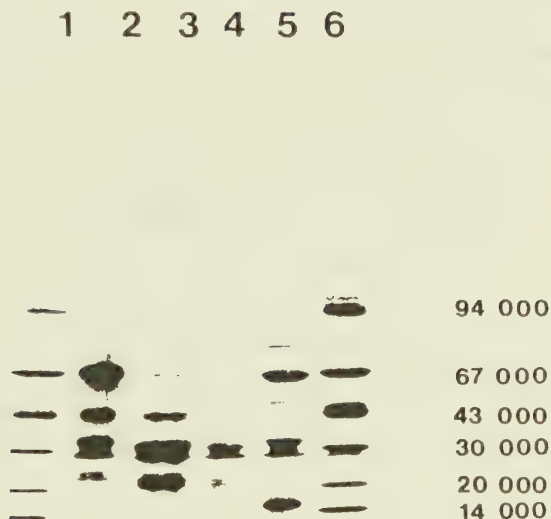
Abbildung 15 zeigt typische Proteinmuster.

Die Spuren 1 und 6 entsprechen den Standards

(Pharmacia Fine Chemicals Low Molecular Weight Kit),

2 und 3 den kristallfreien, 4 und 5 den Kristallhaltigen Proben.

Abbildung 15



SDS-Elektrophorese; Proteinmuster

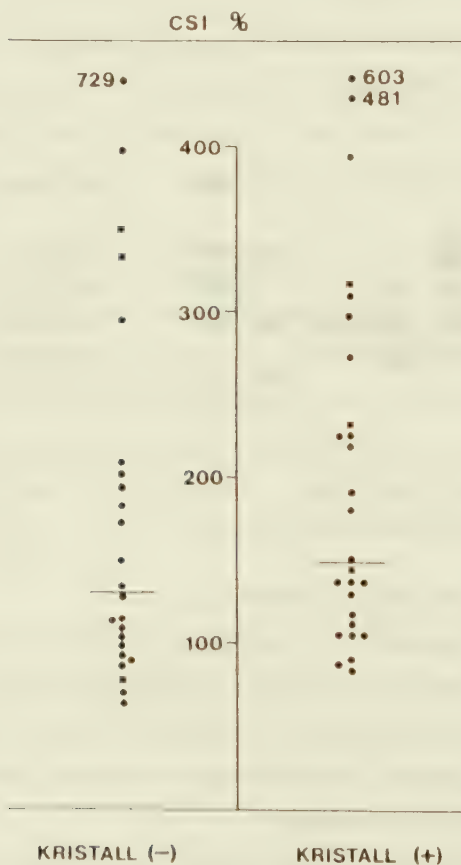
5.11. Berechnung des "korrigierten CSI"

Aus den Gallensäure-, Phospholipid- und Cholesterinkonzentrationen errechneten sich für die Kristallgallen CSI-Werte zwischen 82% und 603%, Median 148%. Die kristallfreien Gallen hatten CSI-Werte zwischen 62% und 729%, Median 130%.

Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant. Die zur Ermittlung des korrigierten CSI benötigte Gesamtlipidkonzentration, d.h. die Summe von Gallensäure-, Phospholipid- und Cholesterinkonzentration in

g/dl wurde für jede Probe gegen die jeweilige Proteinkonzentration aufgetragen (Abb.17).

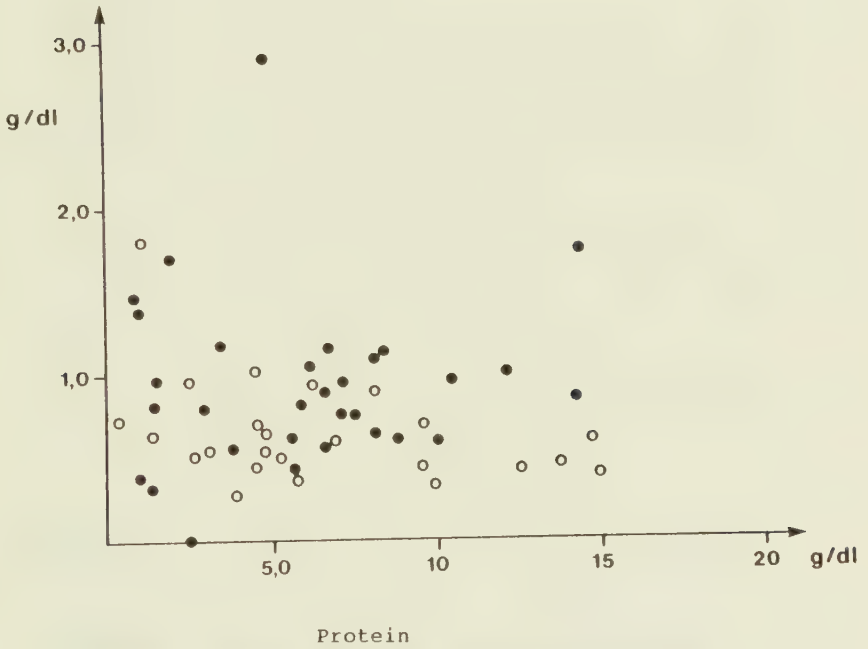
Abbildung 16



CSI - Werte nach Carey und Small in %

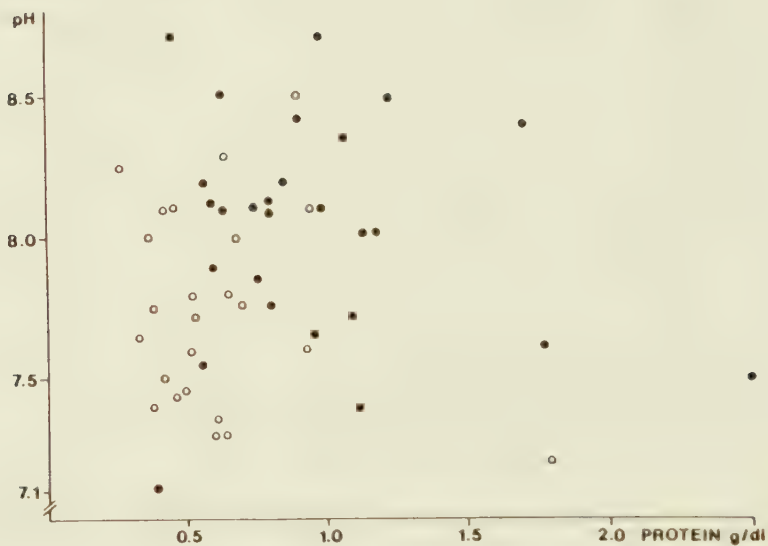
Abbildung 17

G
e
s
a
m
t
l
i
p
i
d
e



Gesamtlipidkonzentration (x-Achse) und Gesamtprotein-
konzentration (y-Achse) von 27 kristallhaltigen (*)
und 24 kristallfreien (o) Gallen.

Abbildung 18



Proteinkonzentrationen und pH-Werte von 27 kristallhaltigen (*) und 24 kristallfreien (o) Gallen

6. Diskussion

6.1. Fragestellung

Literaturangaben wiesen auf die Cholesterinmonohydrat-kristalle als eine unverzichtbare pathogenetische Grundlage für die Entstehung von Cholesteringallensteinen hin (2,37,38).

Andere Untersuchungen ergaben ferner, daß die Cholesterinkristalle überproportional häufig bei Cholecystolithiasis vorhanden sind (47).

Da entgegen früherer Meinung die Übersättigung der Galle mit Cholesterin allein nicht ausreicht (19), das Auftreten von Kristallen zu erklären, erschien die Suche nach weiteren möglichen Ursachen sinnvoll.

In der Literatur sind zahlreiche Einflußfaktoren beschrieben (4,20,26), die Angaben sind jedoch zum Teil widersprüchlich.

Die Suche nach möglichen Ursachen der Nukleation von Cholesterin sollte die Nachuntersuchung früherer Beobachtungen mit modernen Methoden und die Suche nach auf Grund theoretischer Überlegungen möglichen Wirkmechanismen umfassen.

Daher wurden die in geringer Konzentration vorhandenen Triglyceride und Freien Fettsäuren bestimmt sowie die für biologische Systeme bedeutsamen Proteine näher

betrachtet.

Schließlich ließ die Abhängigkeit der Funktion biologisch wichtiger Moleküle wie Gallensäuren und Proteine vom umgebenden Ionenmilieu die Messung des Nativ-pH-Wertes notwendig erscheinen. Zudem lagen zu dieser Frage noch keine Literaturangaben vor.

6.2. Patienten

Die Gewinnung von menschlichem Probenmaterial zu experimentellen Zwecken unterliegt erheblichen Einschränkungen, da die Gesundheit der Patienten auf keinen Fall beeinträchtigt werden darf.

Daher konnten die Proben nur bei Cholecystektomien gewonnen werden. Somit waren in allen Fällen Gallensteine vorhanden, was jedoch der Aussagekraft der Studie nicht beeinträchtigt, da sich die Gruppeneinteilung am Vorhandensein der Cholesterinkristalle orientierte.

Da bei Cholecystektomien anfallenden Gallensteine zunächst nicht zur Verfügung standen, konnten sie nicht auf ihren Cholesteringehalt untersucht werden. Da jedoch die Cholesterinkristalle allein eine wesentliche Aussage über die Lithogenität der Galle ermöglichen (38), schien die Steinalyse nicht unverzichtbar.

6.3. Probengewinnung

Die Probengewinnung durch intraoperative Punktion der Gallenblase wurde bereits vielfach angewandt; sie stellt die effizienteste Möglichkeit zur Gewinnung frischer menschlicher Blasengalle dar (4,18,31).

Der Ausschluß "weißer Gallen" sowie bakteriell kontaminierter Proben ist zur Vermeidung von Artefakten erforderlich (46).

Der Transport unter Luftabschluß und Temperaturkonstanz diente dem Ausschluß von Störungen seitens der Atmosphäre und durch eventuelle Abkühlung.

6.4. Kristallanalyse

Die in dieser Studie durchgeführte Art der mikroskopischen Kristallanalyse weicht von der in der Literatur meist beschriebenen (6,18,38) ab. Dort wurde die Galle zentrifugiert oder ultrazentrifugiert; anschließend wurde das Sediment im Polarisationsmikroskop untersucht.

Durch die Zentrifugation entstanden jedoch möglicherweise Artefakte durch Schichtbildung. Zwar sind dann noch geringste Mengen Kristalle nachweisbar, derartig kleine Mengen können jedoch durchaus auf Artefakte und Verunreinigungen zurückzuführen sein.

Ferner erlaubte die Phasenkontrastmikroskopie den Nachweis von Kristallen auch dann noch, wenn sich die

Kristalle wegen zu geringer Größe oder Zahl im Polarisationsmikroskop bereits nicht mehr nachweisen liesen. Dies konnte an 10 Proben, die mit beiden Methoden untersucht wurden, gezeigt werden.

Zwar erlaubt die Polarisationsmikroskopie eine eindeutige Identifizierung der doppelbrechenden Cholesterinkristalle, einem geübten Beobachter ist es jedoch auch im Phasenkontrastmikroskop möglich, Cholesterinkristalle an ihrer charakteristischen Form einwandfrei zu identifizieren.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß die Phasenkontrastmikroskopie eine höhere Sensitivität gegenüber der Polarisationsmikroskopie aufweist, so daß auf die möglicherweise artefaktbeladene Zentrifugation verzichtet werden konnte.

Admirand und Small (1) fanden in einem dem vorliegenden vergleichbaren Kollektiv in 42% der Fälle Kristalle, im untersuchten liegt die Quote bei 53%. Dieser Wert liegt allerdings niedriger als in der Publikation von Sedaghat und Grundy (38), wo in 11 von 17 steinhaltigen Blasengallen (64%) Kristalle initial nachzuweisen waren.

Diese Abweichungen sind durch unterschiedliche Kollektive - im vorliegenden Fall nur Mitteleuropäer mit Cholelithiasis - zu erklären (44).

In anderen Studien wurde zusätzlich zur Mikroskopie der frischen Galleproben die Nukleationszeit bestimmt

(13).

Diese Größe macht eine Unterscheidung zwischen "normalen" und "pathologischen" Gallen möglich (18); die Bestimmung erfordert jedoch die Reinigung der Galle durch Ultrazentrifugation. Dabei treten Schichtbildungen in der Probe auf; derzeit kann nicht gesagt werden, ob dabei nicht Verfälschungen auftreten. Da Versuche, die Galle anderweitig, z.B. durch Filtration von Kristallen zu reinigen, nicht erfolgreich waren, wurde auf die Bestimmung der Nukleationszeit verzichtet.

6.5. Bestimmung des pH-Wertes

Die pH-Messung mit einer handelsüblichen Glaselektrode unter N₂-Abschluß erscheint als einfaches, gut reproduzierbares Verfahren. Die Untersuchung der zeitlichen Veränderungen des pH-Wertes in der Galle zeigte, daß innerhalb von zwei Stunden keine wesentlichen Änderungen eintreten. Abweichungen in der Zeit von der Probengewinnungen bis zur pH-Mesung lagen ohnehin nur im Bereich von Minuten.

Eine Beeinflussung der pH-Werte durch bakterielle Kontamination ist ohnehin nicht zu erwägen, da nur sterile Proben in die Studie aufgenommen wurden. Ein Vergleich zu Literaturangaben ist nicht möglich, da derzeit keine Arbeiten über die pH-Verhältnisse in nativer Blasengalle vorliegen.

Da sich zwischen kristallhaltigen und kristallfreien

Proben signifikante Unterschiede hinsichtlich des pH-Wertes ergaben, und die biologische Aktivität vieler Moleküle, besonders der Proteine und der Gallensäuren (22) stark pH-abhängig ist, erscheint ein Zusammenhang zwischen pH-Wert der Galle und dem Auftreten der Cholesterinkristalle zumindest wahrscheinlich.

6.6. Gesamtgallensäurekonzentration

Beim Vergleich der gefundenen Gesamtgallensäurekonzentrationen mit der Literatur (1,6,18,19) fallen deutlich niedrigere Werte auf. Im vorliegenden Kollektiv lag der Median der Gallensäurekonzentration bei 88,2 mmol/l für die kristallhaltigen und bei 75,1 mmol/l für die kristallfreien Gallen.

Literaturangaben liegen bei Durchschnittswerten zwischen 135 mmol/l und 199 mmol/l für Normalkollektive und bei 87 mmol/l bis 132 mmol/l für Steinträger. Dabei fallen in den oben zitierten Arbeiten große Unterschiede zwischen regional verschiedenen Kollektiven wie Amerikanern und Schweden auf (18). Da die vorliegenden Ergebnisse mit der in den meisten bekannten Arbeiten verwandten 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenasemethode erstellt wurden, sind die am unteren Rand der Literaturangaben liegenden Gallensäurekonzentrationen am ehesten auf das Patientenkollektiv, das ausschließlich aus Mitteleuropäern bestand, zurückzuführen.

6.7. Phospholipidkonzentration

Die zur Phospholipidbestimmung verwandten Methoden wurden zunächst anhand von 13 Galleproben verglichen; der enzymatischen Methode wurde wegen der nicht vorhandenen Extraktionsverluste der Vorzug gegeben.

Außerdem lies sich die enzymatische Phospholipidbestimmung im Routinebetrieb leichter handhaben.

Die gefundenen Werte liegen im Bereich der Literaturangaben (1,6,19).

Dies, sowie die von den Erstbeschreibern (16) durchgeführten Qualitätsprüfungen lassen die enzymatische Methode zuverlässig erscheinen. Die Tatsache, daß mit dieser Reaktion nur die cholinartigen Phospholipide erfaßt werden, fiel nicht ins Gewicht, da das Lecithin ohnehin 98% der Phospholipide in der Galle ausmacht (23).

6.8. Cholesterinkonzentrationsmessung

Da wegen der Störung durch Gallenpigmente und Gallensalze keine Möglichkeit besteht, das Cholesterin in der Galle wie die Phospholipide direkt zu bestimmen, mußte auf die Extraktion mit Petrolbenzin zurückgegriffen werden.

Beim anschließenden Einsatz der colorimetrischen Methode zeigte sich eine hohe Korrelation mit den Ergebnissen der enzymatischen CHOD - PAP - Methode ($r=0,94$). In Vorversuchen hatte sich jedoch immer wieder gezeigt, daß das nach dem Abdampfen des Petrol-

benzins an den Reagenzgläsern haftende Cholesterin nicht vollständig in der Reaktion oxydiert wurde. Daher wurde zur Cholesterinbestimmung die für die hohen Konzentrationen in der Galle ausreichend empfindliche colorimetrische Methode eingesetzt. Die gefundenen Werte liegen im Bereich der Literaturangaben (1,6,19).

6.9. Triglyceridbestimmung

Frühere Literaturangaben wiesen auf das Vorkommen von Triglyceriden in der Galle hin (32). Daher wurde der Versuch einer Quantifizierung unternommen. Vollenzymatische Methoden erwiesen sich als für die Galle ungeeignet. Eine quantitative Extraktion mit organischen Lösungsmitteln, ähnlich wie beim Cholesterin, war wegen der geringen Ausgangskonzentrationen nicht erfolgversprechend.

Deshalb wurde die alkalische Verseifung mit äthanolischer KOH gewählt, bei der in der Fällung der Fettsäuren mit Magnesiumsulfat die meisten Verunreinigungen entfernt werden. Ob die Meßgrößen frei von Beeinträchtigungen durch andere Störfaktoren waren, konnte nicht sicher ausgeschlossen werden.

Für die Proben, die keine Reaktion zeigten, wurde eine Triglyceridkonzentration von 0,00 mmol/l angenommen, möglicherweise war jedoch der Reaktionsablauf durch in der Galle entstandene Störfaktoren blockiert.

Da die quantitativen Bestimmungen derart unzuverlässig

sind, die statistische Auswertung keine Unterschiede zwischen den den Gruppen aufzeigte und die Konzentrationen scheinbar sehr niedrig sind, ist nicht anzunehmen, daß sich aus der Untersuchung der Triglyceride weitere Aufschlüsse über die pathogenetischen Abläufe der Cholesterinnukleation gewinnen lassen.

6.10. Bestimmung der Freien Fettsäuren

Einzelne Literaturangaben (29,32) wiesen auf das Vorkommen von Freien Fettsäuren in der Galle hin. Daher wurden diese quantitativ bestimmt.

Da colorimetrische Verfahren, bei denen die Carboxylgruppen der Freien Fettsäuren Kupferionen komplex binden und in eine apolare Phase überführen, von anderen Komplexbildnern wie Phospholipiden gestört werden, mußten enzymatische Methoden eingesetzt werden. Die enzymatische Reaktion wird jedoch von Gallebestandteilen gehemmt, so daß eine vorherige Extraktion erforderlich ist. Die Problematik einer quantitativen Lipidextraktion aus biologischen Flüssigkeiten wurde bereits mehrfach angesprochen und ist sinngemäß auch in diesem Fall zu berücksichtigen.

Somit sind die Daten nur bedingt verwertbar, ein Vergleich mit Literaturangaben ist nicht möglich, da Nakajama 1962 (32) nur den Anteil an der Gesamtlipidmasse angibt und Mingrone 1983 (39) die Werte auf Trockensubstanz bezieht.

Da sich in der vorliegenden Arbeit keine statistisch

relevanten Unterschiede hinsichtlich der freien Fettsäuren erkennen liesen, erscheint deren Bedeutung für die Cholesterinnukleation gering zu sein.

6.11. Quantitative Proteinbestimmung

In der Literatur sind unterschiedliche Methoden zur Proteinbestimmung in der Galle beschrieben (18,20,27), in der vorliegenden Arbeit wurde eine Modifikation der von Lowry angegebenen Methode verwandt. Bei diesem Vorgehen konnte durch die Extraktion der Gallensalze und -pigmente mittels Methanol der störende Einfluß dieser Größen zurückgedrängt werden.

Die damit gefundenen Proteinkonzentrationen liegen in der Größenordnung der von Holzbach e.a. (20) fluorometrisch gemessenen Konzentrationen.

Im Widerspruch zu Literaturangaben (3,13), die bei Steingallen die höheren Proteinkonzentrationen fanden, waren die Proteinkonzentrationen in dieser Studie bei kristallhaltigen Gallen höher.

Dieses Phänomen wurde auch von Gallinger et.al. (13) beobachtet.

Obgleich sich die gefundenen Werte nicht mit der gesamten Literatur decken, müssen sie als Grundlage für weitere Überlegungen dienen. Eine Bedeutung der Proteine für die Nukleation des Cholesterins muß jedenfalls angenommen werden (13,38), wenn auch noch keine Vorstellungen über die pathophysiologischen Abläufe existieren.

In Zusammenhang mit dem ebenfalls bei Kristallträgern erhöhten pH-Wert ist an die Beeinflussung der Proteinfunktion durch Änderungen des Ionenmilieus zu denken. Die bereits oben erwähnten Ergebnisse von Gallinger (13), die Pigmentsteinträger mit Cholesterinsteinträgern verglichen, lassen eher eine kausale Bedeutung der Proteine für die Cholesterinsteinbildung vermuten als sie als Epiphänomene erscheinen.

6.12. SDS-Polyamidgelelektrophorese

Da sie an einem anderen Kollektiv erstellt wurden, sind die Ergebnisse der Polyamidgelelektrophorese neben den anderen Ergebnissen zu sehen.

Die Proteinmuster wiesen starke individuelle Schwankungen auf, eine Unterscheidung zwischen einem typischen "Kristallmuster" und einem typischen Muster einer kristallfreien Galle war nicht möglich.

Nach Literaturangaben (8,31) gelangen die Proteine teils durch Molekularsiebe in Abhängigkeit vom Molekulargewicht, teils durch aktiven Transport vom Plasma in die Galle. Dadurch ist ein Einfluß auf die Löslichkeit des Cholesterins jedoch nicht erklärt. In diesem Zusammenhang ist die physicochemische Verknüpfung von biliären Proteinen und Lipiden, die nicht bekannt ist, wohl von entscheidender Bedeutung.

6.13. Berechnung des Cholesterinsättigungsindex (CSI)

Der Cholesterol Saturation Index (CSI) ist eine aus den Konzentrationswerten der Gallensäuren, Phospholipide und des Cholesterin abgeleitete Größe, deren Genauigkeit von den Ausgangsgrößen abhängt.

Es sind zahlreiche Möglichkeiten zur Ermittlung eines CSI angegeben (1,43), die von Carey und Small beschriebene (6) ist am genauesten, da sie den Einfluß der Gesamtlipidkonzentration auf die Löslichkeit des Cholesterins berücksichtigt.

Da das verwendete Computerprogramm anhand der in der Originalarbeit enthaltenen Beispiele überprüft wurde, sind Rechenfehler ausgeschlossen.

Eine statistische Signifikanz hinsichtlich der CSI-Werte beider Gruppen zeigte sich nicht.

Dies steht im Einklang mit der Literatur, wo immer wieder gezeigt wurde, daß zwischen den CSI-Werten und den Lösungsverhältnissen in den jeweiligen Gallen keine wesentlichen Zusammenhänge bestehen (9,19,37,50,51).

Da Modellsysteme, die nur die Lipidanteile der Galle berücksichtigen, die Grundlage für die CSI-Berechnungen darstellen, erlauben diese nur ungenaue Aussagen über die natürlichen Verhältnisse.

6.14. Interpretation der Ergebnisse

Zahlreiche Arbeiten zeigten die essentielle Bedeutung der Cholesterinkristalle als Vorläufer der Cholesterinsteine auf. Ihr Vorhandensein charakterisierte "lithogene Gallen" eindeutiger als andere Parameter (37,38).

Ferner war bereits bekannt, daß bisher noch nicht definierte Ursachen Kristalle in Steingallen schneller wachsen ließen als in Normalgallen (13,18). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen außerdem, daß die Analyse der drei Hauptlipidkomponenten Gallensäuren, Phospholipide und Cholesterin in Verbindung mit der Berechnung des CSI eine Unterscheidung von Normal- und Steingallen nicht erlaubte (21,33).

Sowohl im vorliegenden Kollektiv wie in anderen Studien (37,38) wurden kristallhaltige untersättigte wie kristallfreie übersättigte Gallen beobachtet. Beide Beobachtungen sind mit der klassischen Theorie der micellären Lösung (6) nicht vereinbar.

Da Modellsysteme, die nur aus den drei Lipidkomponenten aufgebaut sind, bei Übersättigung immer Kristalle bilden, müssen für das Verhalten natürlicher Gallen andere Erklärungen gefunden werden.

Zunächst besteht die Möglichkeit, daß der Cholesterintransport in der Galle nicht ausschließlich auf micellärem Weg erfolgt.

Dafür sprechen die Messungen der Partikelgröße in natürlicher Galle, wobei besonders bemerkenswert war,

daß der Anteil großer Lipidpartikel mit abnehmender Gallensäurekonzentration zunahm. Die Autoren nehmen in diesem Fall eine Bindung von Gallensäuren durch Proteine an (41,42).

Eine andere Überlegung ginge dahin, daß nicht lipidartige Moleküle wie Mucin (26) die Nukleation des Cholesterins fördern könnten. Diese Annahme wäre insbesondere geeignet, das Auftreten von Kristallen in rechnerisch untersättigten Lösungen zu erklären, die aber aus thermodynamischen Gründen doch eine Übersättigung aufweisen müssen.

Die dritte mögliche Hypothese besagt, daß micellär gelöstes Cholesterin von antinucleierenden Faktoren (18,20,21) bei Übersättigung am Nukleieren gehindert wird. Quantitative oder funktionelle Insuffizienz dieser Agentien würde die Nukleation auslösen.

Die Nukleationszeitverlängerung durch gallenspezifische Proteine (20) stützt die letztgenannte Überlegung. Dabei wurde auch erkannt, daß Albumin keinen entsprechenden Einfluß ausübt.

Andererseits wurden bisher noch keine spezifisch nukleationshemmenden oder -fördernden Proteine charakterisiert; auch in der vorliegenden Studie zeigte die

SDS-Elektrophorese keine spezifischen Unterschiede. Die bisherige Diskussion der Vorgänge bei der Cholesterinnukleation und beim Cholesterintransport ließ den pH-Wert unberücksichtigt.

In der vorliegenden Studie wurden in den kristallhaltigen Gallen signifikant höhere pH-Werte beobachtet.

Die Abhängigkeit der Funktion der meisten, besonders aber der Proteinmoleküle von der richtigen Einstellung des pH macht die Bedeutung für die Kristallisation verständlich. Je weiter sich der pH-Wert vom physiologischen Wert im Blut entfernt, umso geringer wird die biologische Aktivität der Plasmaproteine, die zumindest einen Teil der Galleproteine ausmachen (8,31).

Ferner sind die Gallensäuren, im wesentlichen die Freien im Gegensatz zu den Konjugierten, in ihrer Detergenswirkung pH-abhängig (22). Nach der einzigen vorliegenden Studie sind reine Gallensäurelösungen nur in einem bestimmten pH-Bereich stabil, Abweichungen ins Alkalische oder ins Saure führen zur Präzipitation. Über die pH-Abhängigkeit der komplexeren Strukturen wie Micellen und Vesikel ist nichts Genaues bekannt.

Obwohl die Auswirkungen des pH-Wertes in der Galle auf die Kristallisation, wie oben dargelegt, plausibel sind, läßt sich mit den vorliegenden Untersuchungen nicht sagen, ob die erhöhten pH-Werte in der Kristallgruppe Ursache oder Folge der zur Nukleation des Cholesterins führenden Vorgänge sind. Zwar existieren Arbeiten über die Anionen (48) und Kationen (18) in der Galle, Untersuchungen über den Säure - Basenhaushalt und Reorptionsvorgänge in der Gallenblasenwand liegen jedoch nicht vor.

Die Untersuchung der Gallenflüssigkeit allein ist also nicht ausreichend, Unterschiede in den physiologischen Gegebenheiten von Gesunden und Steinträgern zu ermitteln, da die Funktion der Gallenblase und der Zustand der Gallenblasenwand unberücksichtigt bleiben.

Einzelne Autoren (24,29) betonen, daß Entzündungsprozesse in der Gallenblasenwand über gestörte Resorptionsprozesse oder die Freisetzung unveresterter Fettsäuren die Gallensteinentstehung fördern könnten.

Bedeutsam erscheint der Aspekt, daß selbst pathologische Galle Nukleationszeiten in der Größenordnung von Tagen aufweist (18), wogegen die Verweilzeit in der gesunden Gallenblase normalerweise nur in der Größenordnung von Stunden liegt.

Da die Indikation zur Cholecystektomie heute oft allein aus dem sonographischen Steinnachweis und der Klinik gestellt wird, lagen nur von 14 Patienten des untersuchten Kollektivs Cholecystogramme vor. Die Hälfte davon zeigte keine oder nur flau Darstellung der Gallenblase. Aus den Daten eines so kleinen Teilkollektivs können freilich keine Schlüsse auf den Einfluß der Gallenblase gezogen werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Tatsache, daß Frauen weit häufiger von Gallensteinen betroffen sind als Männer, im vorliegenden Kollektiv 38 Frauen gegenüber 13 Männern. Gleichzeitig war der Frauenanteil mit 85% in der Kristallgruppe höher als in der kristallfreien Gruppe (63%). Offen bleibt in diesem Zusammenhang die Rolle der Sexualhormone, die den Tonus der Gallenblasenmuskulatur herabsetzen und die Entleerung erschweren sollen (24).

6.15. Resultierende Fragestellungen

Um einen weiteren Aufschluß über die Vorgänge, die zur Nukleation des Cholesterins führen, sind zunächst Untersuchungen über die normalen Transportsysteme in unter- und übersättigter Galle erforderlich (42).

Ein tiefergehendes Verständnis der Pathophysiologie wird sich nur aus der ganzheitlichen Betrachtung von Leber und Art der Lipidsekretion, Gallenwegen und Gallenblase, sowie eventuell auch des Dünndarms ent-

wickeln können.

Zwar liegen bereits Arbeiten über die Herkunft der biliären Proteine und die Bedeutung der Leber bei ihrer Abtrennung aus dem Plasma vor (31), die Verknüpfung mit der Sekretion der Lipide ist jedoch nicht ausreichend bekannt.

Weiterhin bedarf es der eingehenden Untersuchung der Gallenblasenfunktion hinsichtlich Motorik und Resorptionsfähigkeit ihrer Wand. Dabei wird auch der Einfluß von Sexual- und Enterohormonen zu untersuchen sein.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bedürfen einer genaueren Klärung. Aus den vorliegenden Daten kann nicht gesagt werden, ob die erhöhten Protein- und pH-Werte der Kristallgallen Ursache oder Folge der zur Nukleation des Cholesterins führenden Vorgänge sind oder gar nur Epiphänomene darstellen. Wenn auch die bereits durchgeführte SDS-Elektrophorese keine Unterschiede in den Proteinmustern erkennen lies, könnten vielleicht aufwendigere Methoden, insbesondere immunologischer Art, eine Differenzierung ermöglichen. Bei all diesen physicochemischen Untersuchungen wird mehr auf eine Gesamtbetrachtung Wert gelegt werden müssen, da die Abtrennung einzelner Fraktionen von den Transportsystemen möglicherweise Artefakte nach sich zieht.

Die pharmakologische Beeinflussung der Galle, beispielsweise durch Choleretica, könnte einenteils Aufschlüsse über alle genannten Faktoren erbringen, andernteils sogar eine Prophylaxe oder Therapie der Cholelithiasis möglich machen.

7. Zusammenfassung

Durch die biochemische Analyse von 51 menschlichen Blasengallen wurde nach Faktoren gesucht, die das Auftreten von Cholesterinkristallen, die als Voraussetzung für die Bildung von Cholesteringallensteinen gelten, begünstigen.

27 der 51 Proben enthielten Cholesterinkristalle, 24 waren kristallfrei.

Hinsichtlich Gesamtgallensäurekonzentration, Phospholipiden, Cholesterin, Triglyceriden, Totallipidkonzentration und Cholesterinsättigungsindex nach Carey und Small ergab die statistische Auswertung keine signifikanten Unterschiede.

Jedoch ergab der U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney signifikant ($p < 0,01$) höhere Proteinkonzentrationen und pH-Werte in der Kristallgruppe.

Daher kann vermutet werden, daß diese Faktoren im Zusammenhang mit der Cholesterinnukleation stehen.

8. Literatur

- 1) Admirand WH, Small DM: The Physicochemical Basis of
Cholesterol Gallstone Formation in Man
J Clin Invest 47: 1043, 1968
- 2) Been JM, Bills PM, Lewis D: Microstructure of
Gallstones
Gastroenterology 76: 548, 1979
- 3) Burnstein MJ, Strassberg SM: Evidence for a Potent
Nucleating Factor in Gallbladder Bile of Cholesterol
Gallstone Patients
Gastroenterology 165 Part 2: 1224, 1982
- 4) Burnstein MJ, Ilson RG, Petrunka CN, Taylor RD,
Strassberg SM: Evidence for a Potent Nucleating
Factor in the Gallbladder Bile of Patients with
Cholesterol Gallstones
Gastroenterology 85: 801, 1983
- 5) Carey MC, Small DM: The Characteristics of Mixed
Micellar Solutions with Particular Reference to Bile
Am J Med 49: 590, 1970
- 6) Carey MC, Small DM: The Physical Chemistry of
Cholesterol Solubility in Bile
J Clin Invest 61: 998, 1978

- 7) Demaker PN, Hijmans, Jensen: Enzymatic and Chemical
Extraktion Determination of Free Fatty Acids Compared
Clin Chem 26: 540, 1980
- 8) Dive Ch, Heremans JF: Nature and Origin of the
Proteins of Bile
Europ J Clin Invest 4: 235, 1974
- 9) Dowling RH, Bell GD, White J: Lithogenic Bile in
Patients with Ileal Dysfuction
Gut 13: 415, 1972
- 10) Falholt K, Lund B, Falholt W: An Easy Colorimetric
Micromethod for Routine Determination of Free Fatty
Acis in Plasma
Clinica Chimica Acta 46: 105, 1973
- 11) Fiske CH, Subbarow Y: The Colorimetric Determination
of the Phosphorous
J Biol Chem 64: 375, 1925
- 12) Folch J, Lees M, Stanley GHS: A Simple Method for the
Isolation and Purification of Total Lipids from
Animal Tissues
J Biol Chem 226: 497, 1956

- 13) Gallinger S, Harvey PRC, Strassberg SM: Human Gallbladder Bile Proteins: Evidence for a Role in the Nucleation Defect of Cholesterol Gallstone Disease
Gastroenterology 88: 1659, 1985
- 14) Gollish SH, Burnstein MJ, Ilson RG, Petrunka CN, Strassberg SM: Nucleation of Cholesterol Monohydrate Crystals from Hepatic and Gallbladder Bile of Patients with Cholesterol Gallstones
Gut 24: 836, 1983
- 15) Godhart G, Levison M, Trotman B, Soloway R: Pigment vs Cholesterol Cholelithiasis
J Dig Dis 23: 877, 1978
- 16) Gurantz D, Laker MF, Hofman AF: Enzymatic Measurement of Choline Containing Phospholipids in Bile
J Lip Res 22: 373, 1981
- 17) Hegardt FG, Dam H: The Solubility of Cholesterol in Aqueous Solutions of Bile Salts and Lecithin
Z Ernährungswiss 10: 223, 1970
- 18) Holan K, Holzbach RT, Herman R, Cooperman A, Claffey W: Nucleation Time: A Key Factor in the Pathogenesis of Cholesterol Gallstone Disease
Gastroenterology 77: 611, 1979

- 19) Holzbach RT, Mitsuko M, Olszewski M, Holan K:
Cholesterol Solubility in Bile
J Clin Invest 52: 1467, 1973
- 20) Holzbach RT, Kibe A, Thiel E, Howell JW, Marsh M,
Herman RE: Biliary Proteins Unique Inhibitors of
Cholesterol Crystal Nucleation in Human Gallbladder
Bile
J Clin Invest 73: 35, 1984
- 21) Howell JH, Holzbach RT, Freedman MR, Marsh M: The
Process of Cholesterol Cholelithiasis: Evidence for
Crystal Nucleation Inhibitors in Human Bile
Hepatology 2: 728, 1982
- 22) Igimi H, Carey MC: pH-solubility Relations of
Chenodeoxycholic and Ursodeoxycholic Acids: Physical-
Chemical Basis for Dissimilar Solution and Membrane
Phenomena
J Lip Res 21: 27, 1980
- 23) Isaakson B: On the Dissolving Power of Lecithin and
Bile Salts for Cholesterol in Human Gallbladder Bile
Acta Societatis Medicorum Uppsaliensis 59: 296, 1954

- 24) LaMorte W, Schoetz DJ, Birkett DH, Williams L: The Role of the Gallbladder in the Pathogenesis of Cholesterol Gallstones
Gastroenterology 77: 580, 1979
- 25) Lee SP, LaMont T, Carey MC: The Role of Gallbladder Mucus Hypersecretion in the Evolution of Cholesterol Gallstones
J Clin Invest 67: 1712, 1981
- 26) Levy PF, Smith Bf, LaMont JT: Human Gallbladder Mucin Accelerates Nucleation of Cholesterol in Artificial Bile
Gastroenterology 87: 270, 1984
- 27) Lowry OH, Rosebrough NH, Farr AL, Randall RJ: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent
J Biol Chem 193: 265, 1951
- 28) Maizel JV jr.: Polyamid Gel Electrophoresis of Viral Proteins
Methods Virol 5: 179, 1971
- 29) Mingrone G, Greco AV, Passi S: The Possible Role of Free Fatty Acids in the Pathogenesis of Cholesterol Gallstones in Man
Biochem Biophys Acta 751: 138, 1983

- 30) Mizuno K, Toyosato M, Yabumoto S: A New Enzymatic Method for Colorimetric Determination of FFA
Analytical Biochemistry 108: 6, 1980
- 31) Mullock BM, Shaw LJ, Fitzharris B, Peppard J, Hamilton MJR, Simpson MT, Hunt TM, Hinton RH: Sources of Proteins in Human Bile
Gut 26: 500, 1985
- 32) Nakayama T, Johnston CH: Fractionation of Bile Lipids with Silicid Acid Column Chromatography
J Lab Clin Med 59: 364, 1962
- 33) Northfield TC, Hofman AF: Biliary Lipid Output During Three Meals and an Overnight Fast
Gut 16: 1, 1975
- 34) Okabe H, Uji Y, Nagashima K, Noma A: Enzymatic Determination of Free Fatty Acids in Serum
Clin Chem 26: 540, 1980
- 35) Paumgartner G, Horak W, Probst P, Grubner G: Effect of Phenobarbital on Bile Flow and Bile Salt Excretion in the rat
Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 270: 98, 1971
- 36) Phillips GB: The Lipid Composition of Human Bile
Biochem Biophys Acta 41: 351, 1960

- 37) Poupon R, Chretien Y, Darnis F: Cristeaux de
Cholesterol, Saturation de la Bile en Cholesterol et
Lithiase Biliaire
Gastroenterol Clin Biochem 8: 260, 1984
- 38) Sedaghat A, Grundy SM: Cholesterol Crystals and the
Formation of Cholesterol Gallstones
N Engl J Med 302: 1274, 1980
- 39) Sewell RB, Mao S, Kawamoto T, LaRusso N: Apoproteins
of High, Low and Very Low Density Lipoproteins in
Human Bile
J Lip Res 24: 391, 1983
- 40) Small DM: Physicochemical Studies of Cholesterol
Gallstone Formation
Gastroenterology 52: 607, 1967
- 41) Sömjen GJ, Gilat T: A Non-Micellar Mode of
Cholesterol Transport in Human Bile
Federation of European Biochemical Societies 156:
265, 1983
- 42) Sömjen GJ, Gilat T: Contribution of Vesicular and
Micellar Carriers to Cholesterol Transport in Human
Bile
J Lip Res 26: 699, 1985

- 43) Swell L, Bell C, Gregory D, Vlahcevic ZR: The
Cholesterol Saturation Index of Human Bile
Dig Diseases 19: 261, 1974
- 44) Swell L, Gregory D, Vlahcevic ZR: Current Concepts of
the Pathogenesis of Cholesterol Gallstones
Medical Clinics of North America 58: 1449, 1974
- 45) Takayama M, Itoh S, Nagasaki T, Tanimizu I: A New
Enzymatic Method for Determination of Serum Choline
Containing Phospholipids
Clinica Chimica Acta 79: 93, 1977
- 46) Trotman BW, Ostrow JD, Soloway RD: Pigment vs
Cholesterol Cholelithiasis: Comparison of Stone and
Bile Composition
Dig Diseases 19: 585, 1974
- 47) Van Der Linden W, Nakayama F: Occurence of
Cholesterol Crystals in Human Bile
Gut 15: 630, 1974
- 48) Waitman AM, Dyck WP, Janowitz HD: Effect of Sekretin
and Acetazolamide on the Volume and Electrolyte
Composition of Hepatic Bile in Man
Gastroenterology 56: 286, 1969

- 49) Weber K, Osborne M: The Reliability of Molekular
Weight Determinations by Dodecyl Sulfate Polyamid Gel
Electrophoresis
J Biol Chem 244: 4406, 1969
- 50) Whiting MJ, Down RH, Watts J: Precision and Accuracy
in the Measurement of the Cholesterol Saturation
Index in Duodenal Bile
Gastroentrology 80. 533, 1981
- 51) Whiting MJ, Watts J: Supersaturated Bile from Obese
Patients Without Gallstones Supports Cholesterol
Crystal Growth but not Nucleation
Gastroentrology 86: 243, 1984

LEBENS LAUF

Am 26. August 1960 wurde ich, Wolfgang Jakob, als Sohn des Ingenieurs Albert Jakob und seiner Ehefrau, der Oberlehrerin Walburga Jakob, geb. Wiesheu, in München geboren.

Im Jahre 1963 übersiedelten wir nach Buchendorf, Lkr. Starnberg, ab 1966 besuchte ich die dortige Volksschule. Von 1968 bis 1970 besuchte ich die Volksschule an der Waliser Straße in München, ab 1970 das Otto-von-Taube-Gymnasium in Gauting. Dort legte ich im Jahr 1979 die Abiturprüfung ab.

Im November 1979 begann ich mein Medizinstudium an der Ludwigs-Maximilians-Universität München, legte im August 1981 die Ärztliche Vorprüfung und im August 1982 das erste Staatsexamen ab.

Im November 1982 begann ich mit dem experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit, famulierte bis zum zweiten Staatsexamen im August 1984 in den Kreiskrankenhäusern von Starnberg, Landsberg und Villefranche-sur-Saone/Frankreich und schloß den experimentellen Teil der Arbeit vor Beginn des Praktischen Jahres ab.

Im Praktischen Jahr war ich in der Münchener Universitätsaugenklinik, in der Internen Abteilung des Kreiskrankenhauses Starnberg und in der Chirurgischen Abteilung des Klinikums Ingolstadt tätig.

Im November 1985 legte ich das dritte Staatsexamen ab,
seit 1.12.1985 bin ich am Zentrum Anästhesiologie der
Universität Ulm tätig.

DANKSAGUNG

Herrn Priv.-Doz. Dr. D. Jüngst danke ich für die Überlassung des Themas und die interessanten wissenschaftlichen Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. G. Paumgartner gilt mein Dank für die Möglichkeit in den Laboratorien der Medizinischen Klinik II zu arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt den Schwestern und Pflegern der Operationssäle im Klinikum Großhadern, insbesondere Herrn Oberstolz, ohne deren tatkräftige Mithilfe die Materialbeschaffung nie möglich gewesen wäre.

Frau cand. med. Maria Bauch danke ich für die wertvolle Unterstützung bei der dreijährigen Laborarbeit.

Die Gelelektrophoresen wurden von Frau B. Häuserer angefertigt.

